

# Utilización de citoquinas recombinantes para la prevención de infecciones en piscicultura: ¿una realidad o una utopía?

*P. Pelegrín, J. García-Castillo, M. P. Sepulcre, V. Mulero y J. Meseguer*

Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. E-30100 Murcia, España.  
Correo electrónico: meseguer@um.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

En el presente estudio se ha clonado el gen de la IL-1 $\beta$  de dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, y se ha producido la correspondiente proteína recombinante para evaluar su uso como inmunoestimulante y adyuvante en peces objeto de cultivo industrial.

**Palabras clave:** *Sparus auratus*, inmunoestimulación.

## ABSTRACT

*Use of recombinant cytokines to prevent infectious diseases in aquaculture: Reality or fiction?*

*The present paper reports on a study in which we cloned the IL-1 $\beta$  gene of the gilthead seabream Sparus auratus Linnaeus, 1758, and produced the corresponding recombinant protein, in order to assess its usefulness as an immunostimulant and vaccine adjuvant in aquaculture.*

**Keywords:** *Sparus auratus*, immunostimulation.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la acuicultura durante los últimos años ha fomentado el interés por el sistema inmunitario de los peces con el fin de poder establecer estrategias adecuadas que permitan controlar la aparición de enfermedades infecciosas. Para este fin, se han utilizado con éxito tanto la vacunación como la inmunoestimulación.

El gran desarrollo de la biología molecular en la última década ha supuesto un avance revolucionario en la mayoría de ramas científicas. La acuicultura no se ha quedado al margen de esta

revolución y, en la actualidad, son numerosos los laboratorios que trabajan en diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, diseño de vacunas de ADN, identificación de genes de resistencia a enfermedades, etc. En esta línea de trabajo se encuadra el presente trabajo, que aborda la clonación molecular de una de las principales citoquinas proinflamatorias, la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) de dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758 y la producción de la correspondiente proteína recombinante para ser evaluada como inmunoestimulante o adyuvante de peces objeto de cultivo industrial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El ARN total de macrófagos estimulados con 10 µg/ml de lipopolisacáridos (LPS) se aisló con trizol y después fue retrotranscrito en cADN con un cebador oligo (dT)<sub>12-18</sub>. Los genes de la IL-1β fueron amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando pares de cebadores específicos degenerados diseñados contra regiones conservadas de las IL-1β de otras especies. Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T-Easy y el ADN plasmídico de varios clones secuenciados, en un secuenciador automático ABI automated 377. Las secuencias obtenidas se utilizaron para diseñar cebadores específicos de los genes con el fin de amplificar los extremos 5' y 3' mediante el sistema extremos de cADN de amplificación rápida (RACE) (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Las proteínas recombinantes fueron producidas en *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919 usando el vector de expresión pET-15b y a continuación purificadas mediante cromatografía de afinidad.

## RESULTADOS

Se obtuvieron mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) tres productos solapados (figura 1) que contenían la secuencia completa del cADN de la IL-1β de dorada. El gen está formado por 1 271 nucleótidos, los cuales incluyen una región traducible de 762 nucleótidos, una región 5' no traducible (5' UTR) de 102 nucleótidos y una 3' UTR de 407 nucleótidos que contiene 7 motivos de inestabilidad del ARN (ATT-TA), típicos de los genes de citoquinas inflamatorias. La secuencia también contiene una cola poli(A) de

19 nucleótidos y una secuencia de poliadenilación situada 14 residuos hacia arriba de la cola poli(A) (figura 2). La región traducible cifra el precursor de la IL-1β de dorada, que sería una proteína de 253 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 29 kDa, dos sitios potenciales de N-glicosilación y, como el resto de secuencias de vertebrados inferiores, carente del sitio de reconocimiento de la caspasa-1.

La IL-1β de dorada muestra el mayor grado de identidad de nucleótidos con las dos secuencias de trucha (60,5 % con el tipo 1 y 61,7 % con el tipo 2), así como en similitud de aminoácidos (67 % con el tipo 1 y 62 % con el tipo 2) (tabla I). Esta estrecha relación con las moléculas de trucha también se ve reflejada en el árbol filogenético (figura 3), donde la secuencia de la IL-1β de dorada se encuentra junto a las IL-1β de otros peces, y alejada de las de mamíferos, anfibios y aves.

## Estudios de expresión

El transcrito de la IL-1β fue detectado en todos los tejidos de los peces infectados con *Listonella an-*

Tabla I. Homología de la IL-1β de dorada con otras secuencias de IL-1β conocidas. Los valores en negrita son los de mayor homología.

	Aminoácidos		Identidad de nucleótidos (%)
	Identidad (%)	Similitud (%)	
Especie humana	32	52	52,0
Ratón	30	50	49,0
Oveja	34	54	52,7
Pollo	32	51	49,9
<i>Xenopus</i>	32	50	48,1
Trucha 1	<b>53</b>	<b>67</b>	60,5
Trucha 2	47	62	<b>61,7</b>
Carpa	32	53	49,0

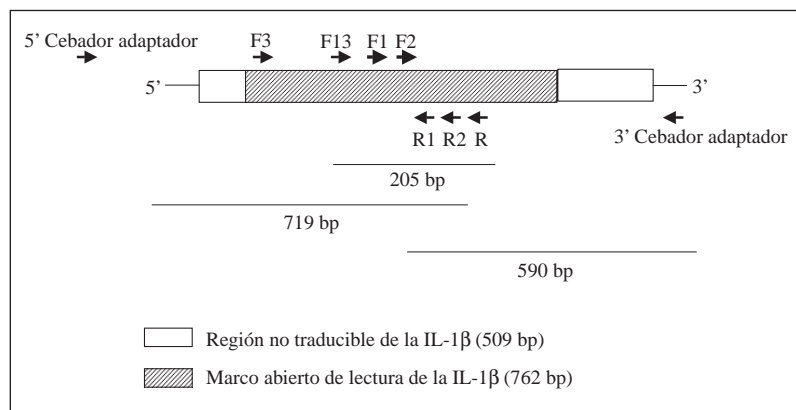


Figura 1. Posición de los cebadores F y R utilizados para amplificar el gen de la IL-1β de dorada y los productos obtenidos. (bp): pares de bases.

Figura 2. Secuencia del cADN de la IL-1 $\beta$  de dorada y de la correspondiente proteína deducida.

GAGAACAACACTGACAGGACAACCTGCTGGGAAAAAC																	-68
CAAACACACTAAAAACACCTCTGATCTACTGACCTTCACAGATCTTACTCAATTTAGAAAAAGAAA																	-1
<b>ATG</b>	GAA	TCC	GAG	ATG	ACA	TGC	AAC	GTG	AGA	GAG	ATG	TGG	AGC	TCC	AAG	ATG	51
<b>Met</b>	Glu	Ser	Glu	Met	Thr	Cys	Asn	Val	Arg	Glu	Met	Trp	Ser	Ser	Lys	Met	17
CCC	GAG	GGG	CTG	GGC	TTG	GAG	ATT	GCC	CAC	CAT	CCC	ATC	ACA	ATG	AAG	AGT	102
Pro	Glu	Gly	Leu	Gly	Leu	Glu	Ile	Ala	His	His	Pro	Ile	Thr	Met	Lys	Ser	34
GTG	GTC	AAC	CTC	GTC	ATC	GCC	ATG	GAG	AGG	TTA	AAG	GGC	AAC	GTG	TTG	GAT	153
Val	Val	Asn	Leu	Val	Ile	Ala	Met	Glu	Arg	Leu	Lys	Gly	Asn	Val	Leu	Asp	51
TCA	CCG	CGG	GGC	ACT	GAG	TTC	ACA	GAT	GAA	AAC	CTG	CTC	AAC	ATC	TTG	CTG	204
Ser	Pro	Arg	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Asn	Ile	Leu	Leu	68
GAG	AGC	GCA	GTA	GAA	GAG	CGA	ACT	GTG	TTC	GAG	CGC	ACT	GCA	AAA	CCA	GCT	255
Glu	Ser	Ala	Val	Glu	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Glu	Arg	Thr	Ala	Lys	Pro	Ala	85
CAG	TAC	ACA	TAC	AAC	TTC	CAG	AGC	CTA	TAC	AGC	GTG	ATG	GAC	AGC	GAG	CAG	306
Gln	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Phe	Gln	Ser	Leu	Tyr	Ser	Val	Met	Asp	Ser	Glu	Gln	102
AGG	CAC	TTA	GTC	CGA	GTG	CCA	AAC	AGC	ATG	GAG	CTC	CAC	GCG	GTG	ATG	CTG	357
Arg	His	Leu	Val	Arg	Val	Pro	Asn	Ser	Met	Glu	Leu	His	Ala	Val	Met	Leu	119
CAG	GGA	GGC	ACT	GGA	AAC	TGT	CAA	GTT	CAA	CTG	AAC	ATG	GCG	ACC	TAC	CTG	408
Gln	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Asn	Met	Ala	Thr	Tyr	Leu	136
CCA	CCT	ACA	CCC	AGT	GCT	GAG	GCC	GTA	ACT	GTG	ACT	CTG	TGC	ATC	AAG	GAC	459
Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Ala	Glu	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Cys	Ile	Lys	Asp	153
ACA	AAT	CTT	TAC	CTG	TCT	TGT	CAC	AAG	GAA	GGT	GAC	GAT	CCA	AGC	TTG	CAT	510
Thr	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser	Cys	His	Lys	Glu	Gly	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	His	170
CTG	GAG	GCG	GTG	GAC	GAC	AAA	GAC	AGT	CTG	TTG	AGG	ATC	ACC	CCG	GCG	AGC	561
Leu	Glu	Ala	Val	Asp	Asp	Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Arg	Ile	Thr	Pro	Gly	Ser	187
GAC	ATG	GCA	CGA	TTT	CTC	TTC	TAC	AAA	CAT	GTC	ACT	GGG	CTG	AAC	AAC	AGC	612
Asp	Met	Ala	Arg	Phe	Leu	Phe	Tyr	Lys	His	Val	Thr	Gly	Leu	Asn	Asn	Ser	204
ACT	CTC	GTG	TCT	GTT	CCC	TTC	AGC	AAC	TGG	TAC	ATC	AGC	ACC	GCA	GAA	GAA	663
Thr	Leu	Val	Ser	Val	Pro	Phe	Ser	Asn	Trp	Tyr	Ile	Ser	Thr	Ala	Glu	Glu	221
AAC	AAC	AAG	CCA	GTG	GAT	ATG	TGC	CAG	GAG	AGT	GCC	AGA	CGC	CAC	CGG	ATC	714
Asn	Asn	Lys	Pro	Val	Asp	Met	Cys	Gln	Glu	Ser	Ala	Arg	Arg	His	Arg	Ile	238
TTC	AAA	TTC	CTG	CCA	CCA	AAG	CCG	GAA	GTG	GAG	GGT	GGA	GAG	TGT	TAA	TTAT	766
Phe	Lys	Phe	Leu	Pro	Pro	Lys	Pro	Glu	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Cys	*		253
AGTGCACCTTCAGATATTCTTCAATTAAGTCAGGAACCAATATGTATTTTATTTTAAAAAGTAC																	833
CAACATTGAATGATAAGACAACCTTCTGCAAGTTTACAGAAAGTCAATTAACCTGTATGTACCAAGTA																	900
CAGAAAGTGAAATGCTATTGTATTGACATAGTCAAGTATCACCACAAGGTGGCATTGTTGTGCTGTC																	967
TGGTGAGCACCCCTGTGTATTTATTTATGCTGAATGACATAAAAAACCCCTGTCATTGCTATTATCTA																	1034
TTAATATATTTATCTATTTATGCAATTATCTTAGCATATTTATTATTTTGATAAATCTGCCTATTAAACA																	1101
ATATTACTATCTAATATGAAGTGAATCTTTAATAAAGCCATCTGACTTACAAAAAAGAAAAA																	1168
A																	1169

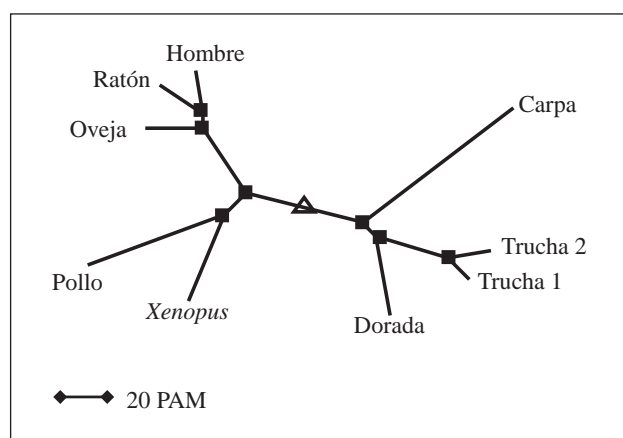


Figura 3. Árbol filogenético que muestra la relación entre la secuencia de aminoácidos de la IL-1 $\beta$  de dorada con otras secuencias de IL-1 $\beta$  conocidas de distintos grupos de animales. El árbol ha sido construido por el método del vecino más cercano con el programa CLUSTAL W. (PAM): porcentaje de mutación aceptada.

*guillarum* (Bergeman, 1909) MacDonell & Colwell, 1986 (figura 4). La expresión es muy escasa en cerebro y alta en sangre y exudado peritoneal. Sorprendentemente se encontró también una expresión basal del transcrito de la IL-1 $\beta$  en muchos de los tejidos examinados de peces no infectados.

Los estudios in vitro indican que el transcrito de la IL-1 $\beta$  es detectado en macrófagos purificados después de sólo 20 ciclos de PCR, mientras permanece ausente en leucocitos totales de riñón cefálico. Este aumento en el transcrito de la IL-1 $\beta$  es particularmente evidente después de estimular los macrófagos con LPS y MAF (factor activador de los macrófagos) (figura 5). Las amplificaciones de  $\beta$ -actina confirman una cantidad similar de cADN de partida en todas las muestras y que la reacción no estaba saturada a los 10 o 20 ciclos.

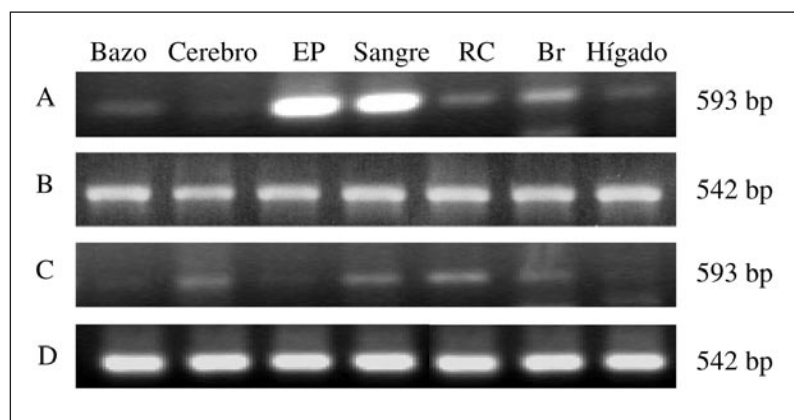


Figura 4. Expresión *in vivo* de la IL-1 $\beta$  en distintos tejidos. Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo con cADN de distintos tejidos de peces no infectados (C, D) o infectados durante 24 h con *L. anguillarum* (A, B). Los productos fueron obtenidos con los cebadores F3 y R2 para la IL-1 $\beta$  de dorada (A, C) o con los cebadores para amplificar la  $\beta$ -actina (B, D). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (RC): riñón cefálico; (EP): exudado peritoneal; (Br): branquia; (bp): pares de bases.

## DISCUSIÓN

En este estudio se muestra la secuencia completa del cADN de la IL-1 $\beta$  de la dorada, pez teleosteo marino de gran interés en acuicultura. La molécula presenta un alto grado de homología con las tres secuencias de IL-1 $\beta$  conocidas de peces, especialmente con los genes de trucha, tanto en los nucleótidos como en los aminoácidos. Las áreas de la molécula con mayor grado de conservación son las que forman la estructura secundaria de doce hojas beta. En común con otras moléculas inflamatorias, la IL-1 $\beta$  de dorada muestra varias copias del motivo ATTTA en su 3' UTR, sugiriendo que la cantidad de ARNm en la célula está delicadamente regulada.

Las IL-1 $\beta$  de todos los mamíferos son sintetizadas como un precursor que es procesado por la caspasa-1 en un Asp-X (donde X es normalmente un

residuo pequeño e hidrofóbico), para producir un polipéptido maduro de 17 kDa derivado del extremo carboxilo, que es inmediatamente transportado al exterior de la célula. La intervención de la caspasa-1 en el procesamiento de la IL-1 $\beta$  de mamíferos sugiere que su procesamiento postransduccional lleva asociada la muerte celular por apoptosis (Laliberte, Eggler y Gabel, 1999). Sin embargo, la IL-1 $\beta$  de dorada carece de la secuencia de reconocimiento y corte de la caspasa-1, al igual que otras secuencias de vertebrados inferiores (Weining *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1999, 2000; Fujiki *et al.*, 2000). Por lo tanto, el sitio de procesamiento y el mecanismo de liberación en estos animales está por descubrir.

Los ejemplares de dorada infectados con *L. anguillarum* muestran una expresión variable del transcrito de la IL-1 $\beta$  en sus tejidos. La mayor expresión aparece en exudado peritoneal y en células

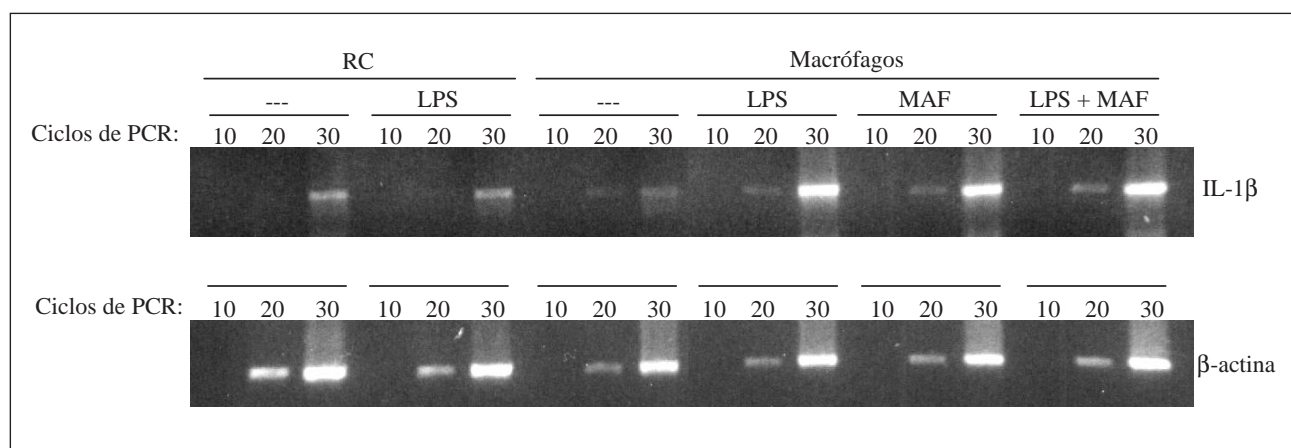


Figura 5. Expresión *in vitro* de la IL-1 $\beta$ . Los experimentos de RT-PCR fueron realizados con cADN de macrófagos o células de riñón cefálico no estimulados o estimulados con LPS (lipopolisacáridos) y MAF (factor activador de los macrófagos). Se recogieron alícuotas de 10 ml después de 10, 20 y 30 ciclos de PCR. Los productos fueron obtenidos con los cebadores F3 y R2 para la IL-1 $\beta$  (A) o con los cebadores para la  $\beta$ -actina (B). (RC): riñón cefálico. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

de la sangre periférica, lo cual no es de extrañar ya que la bacteria fue inyectada intraperitonealmente y es una cepa no virulenta incapaz de abandonar esta cavidad y colonizar otros órganos del pez. El aumento en sangre es más difícil de explicar, pero es lógico pensar que mediadores solubles producidos por las células del exudado peritoneal en respuesta a la bacteria podrían alcanzar los vasos sanguíneos locales activando a los leucocitos circulantes. Un resultado inesperado fue que el transcrito de la IL-1 $\beta$  también fue encontrado en algunos de los tejidos de los ejemplares no infectados, en contraste con recientes estudios en trucha que no han encontrado expresión basal del transcrito de la IL-1 $\beta$  (Zou *et al.*, 1999).

Los monocitos y macrófagos son las principales células encargadas de producir IL-1 $\beta$ , pero la información acerca de los tipos celulares que producen esta molécula en peces es escasa. En este estudio, los macrófagos de dorada presentan una mayor expresión del transcrito de la IL-1 $\beta$  que las células totales de riñón cefálico, sugiriendo que son las principales células productoras de IL-1 $\beta$  en peces. Por otra parte, la expresión de la IL-1 $\beta$  en los macrófagos de dorada aumenta tras ser estimulados con LPS y MAF, siendo ésta la primera demostración de que las citoquinas producidas por linfocitos de peces activados son capaces de regular positivamente la producción de IL-1 $\beta$  por los macrófagos. Dicho resultado sugiere que las linfocinas producidas en el curso de una infección pueden regular la producción *in vivo* de esta molécula proinflamatoria.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor C. Secombes (Universidad de Aberdeen, Reino Unido) por cedernos la secuencia de los cebadores F13 y R, y a los profesores. A. E. Toranzo y J. L. Barja por la bacteria. Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto PB98-0387 y una beca de FPI –formación de personal investigador–) y a una beca concedida por la Fundación Séneca, Centro de Coordinación de la Investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Fujiki, K., D. H. Shin, M. Nakao y T. Yano. 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 229-242.
- Laliberte, R. E., J. Eggler y C. A. Gabel. 1999. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J. Biol. Chem.* 274: 36944-36951.
- Weining, K. C., C. Sick, B. Kaspers y P. Staeheli. 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* 258: 994-1000.
- Zou, J., P. S. Grabowski, C. Cunningham y C. J. Secombes. 1999. Molecular cloning of interleukin 1beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine* 11: 552-560.
- Zou, J., S. Bird, R. Minter, J. Horton, C. Cunningham y C. J. Secombes. 2000. Molecular cloning of the gene for interleukin-1 beta from *Xenopus laevis* and analysis of expression in vivo and in vitro. *Immunogenetics* 51: 332-338.